

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

東海、台灣海峽及南海產紅斑赤蝦之系群遺傳結構、擴張 及混合比例之研究(II) 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2313-B-366-001-
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：樹德科技大學通識教育學院

計畫主持人：曾宗德

計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：陳俊銘
碩士班研究生-兼任助理人員：李志堯

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 99年08月23日

東海、台灣海峽及南海產紅斑赤蝦之系群遺傳結構、擴張及混合比例 之研究 (2/2)

中文摘要

本年度主要目的係利用Elongation factor I-alpha (*efl- α*)基因中之插入子序列及六個微衛星基因座來判別東海、台灣海峽及南海產紅斑赤蝦之系群遺傳結構。本研究共採得4個樣本，分別來自於東海 (ECS)、台中外海(TC)、茄定外海(CD)及香港外海(HK)。

所有被分析之紅斑赤蝦*Efl- α* 插入子序列之核甘酸歧異度(π)為0.933%，各樣本 π 值範圍從1.021% (CD)至0.838% (ECS)之間。檢定各樣本間固定指數(*Fst*)值，顯示除TC-CD與ECS-HK兩樣本配對間沒有顯著差異外，其餘各配對間皆有顯著的差異。以*Fst*值為距離係數，建構各樣本之UPGMA樹狀圖發現，TC與CD樣本為一群；ECS與 HK 為另一群。全部樣本、各採樣族群及不同分支之Fu's *F*值皆顯著，顯示此研究海域之紅斑赤蝦族群有擴張之情形。

本研究所開發之六個微衛星基因座，皆具有高度的遺傳變異，其平均的allele豐富度(A_R)範圍從6.62到9.89，平均異質性(*He*)從0.741到0.830。所有的loci皆顯著於哈溫平均(Hardy-Weinberg equilibrium)。檢定各樣本間固定指數(*Fst*)值，顯示TC 與 ECS、ECS 與 SCS，ECS 與 CD及TC 與 CD 配對間有顯著的差異。以*Fst*值為距離係數，建構各樣本之UPGMA樹狀圖發現，ECS為一群；TC、CD 與 HK 為另一群。

從以上結果顯示，本研究海域產之紅斑赤蝦至少可分為二個系群；一個位於東海北部；另外一個則為台灣海峽(TC與CD)及南海(HK)。唯本研究之結果，仍須更進一步之檢視。

關鍵詞：東海、台灣海峽、南海、紅斑赤蝦、微衛星基因座、*Efl- α* 插入子

Stock genetic structure, expansion and mixture proportion of red-spotted prawn (*Metapenaeopsis barbata*) in the East China Sea, Taiwan Strait and South China Sea (2/2)

Abstract

The purposes of this year is to elucidate the stock genetic structure of red-spotted prawn (*Metapenaeopsis barbata*) in the East China Sea, Taiwan Strait and South China Sea by sequences analyses on the Elongation factor I-alpha (*efl- α*) and six microsatellite loci. Four samples were collected. They are separated into the north of the East China Sea (ECS), the waters off Taichung (TC), the waters off Cheding (CD) and the waters off Hongkong (HK).

Nucleotide diversity of sequences of *efl- α* sequenced in the total populations is 0.933%, and the variations within populations ranged from 1.021% (CD) o 838% (ECS). All *F_{st}* values between 4 populations were significant except the ones from pairs of TC and CD and ECS-HK. The UPGMA tree of these four populations were divided into two groups; one included ECS and HK, the others included TC and CD. The Fu's *F* values from all individuals, four sampling areas and different clades were significant, and indicated the red-spotted prawns from the studied waters experienced population expansion.

Six polymorphic microsatellite loci of the red-spot prawn were developed by PIMA method. High genetic variability with mean allele richness ranges from 6.62 to 9.89, and mean heterozygosity (*He*) from 0.741 to 0.830. All loci were significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium, due to the heterozygote deficiency. The *F_{st}* values between ECS and the other three areas and between TC and CD were significant. The UPGMA tree of these four populations based on *F_{st}* values were divided into two groups; one included ECS, the others included TC, CD and HK.

Two distinct populations at least exist in the studied areas; one is in the ECS; the other is in Taiwan Strait and South China Sea. However, this result must further be verified in the future.

Keyword: East China Sea, Taiwan Strait, South China Sea, *Metapenaeopsis barbata*, *Efl- α* intron, Microsatellite loci

一、前言

東海及南海為我國拖網漁業之傳統漁場。近年來，各國相繼宣告 200 浬經濟海域後，由於部分經濟海域交相重疊，故而開啟協商機制以共同管理漁業資源，尤其如東海漁場中國、韓國及日本等已相繼完成雙邊漁業談判，並訂出共同管理暫訂水域之共識。為因應未來東海及南海漁業資源共同管理時代的來臨，並確保我國漁民應有的漁業權益，加強東南海漁業資源之評估管理研究，實為刻不容緩之重要課題。東、南海之底棲資源種類相當豐富。據台灣地區底魚漁業年報(1985~2004)之統計，蝦類佔拖網漁業總漁獲量之比例，自 1991 起已有顯著之增加，近年來蝦類產量更已躍居首位。因此，蝦類資源對以東海及南海為主要漁場之台灣拖網漁業之重要性，不言而喻。另外，蝦類是位於生態系食物鏈的底層，其數量的多寡是維繫整個生態系的基石，此亦顯示出蝦類資源管理的重要性。因此，針對特定蝦種進行資源評估，以提供適當的漁業管理策施，達到永續利用，是目前最首要之工作。然而，為評估及管理該漁業生物資源，最基礎且必要的工作，即是對特定蝦類資源的系群結構加以研析。

判別系群組成與結構之方法很多，如漁獲統計法、形態形質法、標識放流法、及遺傳生物化學法等，但因為不同的系群判別法各有其優缺點，因此，常需要使用多種不同方法加以分析比較，綜合成果，再研判其系群組成。近年來，由於聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)之自動化，其僅須微量的DNA 模板(Template)且不需要新鮮樣本，即可增幅大量特定之DNA片斷，而使得藉由偵測DNA等遺傳物質中鹼基變異情形之分子遺傳分析法，已成為系群結構之主要研究方法之一。目前最為廣泛利用的DNA分子遺傳標識，包含有核外之粒線體DNA、核介入子(Nuclear intro)及微衛星基因座(Microsatellite)等遺傳標誌。

紅斑赤蝦是東海及南海之經濟蝦種中，產量最豐富的蝦種(Wu, 1985)，其分佈範圍南至印尼、馬來半島，北至中國大陸、日本，相當廣泛(Wu, 1984; Wu, 1985; Yamada et al., 1986; 劉和鍾, 1998)。過去國外有關紅斑赤蝦之研究主要是偏向於分類、分佈及類緣關係之研究(如Yamada et al., 1986; 劉和鍾1998; Tong et al., 2000; Quan et al., 2004; Voloch et al., 2005)；而我國對紅斑赤蝦之研究，主要包含有漁場之分佈(Wu, 1985)及漁業生物學方面(Wu, 1984; Lee, 1986; Tzeng and Yeh, 1995; Tzeng et al., 2001; Tzeng et al., 2005)。過去針對紅斑赤蝦資源之系群判別分析，僅只限利用形態形質法研析台灣附近海域紅斑赤蝦之系群結構(Tzeng et al., 2001)，結果顯示台灣附近產紅斑赤蝦可能分為兩個系群，一個在東海南部；另一個在台灣附近的海域。雖然，形態形質是最常被使用來判定系群結構之標誌，但是形態形質有一缺點即是其容易受環境因子的影響，不同樣本間形質的變異可能並非直接反應出遺傳上的差異，而只是反應出環境的不同而已。因此，利用形態形質法判定系群組成之結果，可能尚需遺傳學上的直接證據加以驗證，以排除環境因子對系群判別之影響 (Pepin and Carr, 1992)。目前最常使用的分子遺傳標誌包含有如粒線體DNA，核內介入子及微衛星基因座等，但因為不同的遺傳標誌各具有不同的優缺點，因此，分析複數個遺傳標誌以研析系群結構，是必需要性的 (Moritz, 1994)。另外，Tzeng et al. (2001) 所研究的海域只局限於台灣

附近水域，但在其它產量也很豐富的地區，如東海北部(長江口)附近、南海等，則尚無資料，因此，有必要再針對東、南海產紅斑赤蝦之系群組成結構，做更整體且完整的探究。

為合理永續利用東海及南海產紅斑赤蝦資源，本研究之主要目的係使用粒線體DNA、核內介入子與微衛星基因座等DNA遺傳標誌，分二年研析紅斑赤蝦資源之系群結構：第一年主要工作係利用粒線體DNA中d-loop (Control region)序列，研析紅斑赤蝦之系群結構；第二年主要工作係利用核內介入子序列之變異及利用微衛星基因座之多型性研析紅斑赤蝦的系群組成結構，並綜合此二年之結果研判紅斑赤蝦資源之系群結構，做出結論，並提出資源評估與管理之建議

二、材料與方法

本研究共採得4個樣本，分別來自於東海 (ECS)、台中外海(TC)、茄定外海(CD)及香港外海(HK)，相關樣本之資訊如Fig. 1、Table 1及Table 4 所示。將收集之肌肉樣本利用標準的phenol-chloroform 粹取純化之方法，萃取Crude DNA。

以下分為核內介入子序列之變異和微衛星基因座之多型性兩部分加以分析：

一、核內介入子序列之變異分析

以此Crude DNA 為模板使用EF0 (5'-TCCGGATGGCATGGCGAGAACATG-3')和 EF2 (5'-ATGTGAGCGGTGTGGCAATCCAA-3') 兩引子，進行Elongation factor I-alpha (efl- α) 介入子序列之增幅。用 12SR (5'- GTGTAACAGGGTATCTAATCGG-3') 及 P30 (5'-GATCTTTAGGGGAATGGTGTAATT- CCAG-3') 兩引子，進行特定DNA片斷之增幅。

本研究聚合梅連鎖反應的條件及其過程分別如下：

P30-P12SR 部分為：

- (1) 95°C，5 分鐘；預熱。
- (2) 95°C，50 秒。將雙股之DNA 變性解開 (Denaturation)。
- (3) 50°C，1 分30 秒。使互補股片段與引子煉合(annealing)
- (4) 70°C，1 分30 秒。此時Super Taq 聚合梅進行反應，在引子 3'端之延伸聚合反應(extension)。

重複(2)~(4)之步驟32 次。

- (5) 72°C，10 分鐘。讓反應不完全之反應，繼續完成複製。

此PCR反應後之產物再由1%之洋菜膠片(Agarose gel)，在TBE buffer 中進行電泳，以判斷反應物的片段長度及產量。電泳反應條件為電壓100V，約一小時後，將洋菜膠片置於0.005%之溴化乙錠(Ethidium Bromide; EtBr)溶液中染色約一小時；再將膠片置於紫外光下拍

照解析，並與標識DNA(DNA marker, 1kb)比較。最後，將 PCR 所得之產物委外進行定序之工作；

將定序所得之序列，先與已發表之蝦子序列進行比對，以界定特定基因之範圍，再利用 ProSeq (Filatov, 2002)軟體分別估計各樣本之核苷酸歧異度(π)、估計並檢定兩兩族群之固定指數 (Fst)。另將估計所得之Fst值為距離係數，利用NTSYS軟體 (Rohlf, 1997)，畫出其樹狀圖。另外利用DnsSP軟體估計所有樣本及各採樣地區Fu's F，並檢驗是否顯著，以推論紅斑赤蝦是否經歷擴張的情形。

二、微衛星基因座之多型性分析

利用微衛星基因座研究系群組成結構分析之方法與步驟如下：

- (1)、利用PIMA (PCR Isolation of Microsatellite Arrays)法發展出微衛星基因座；將發展出來的基因座相對之配對引子在5'端，以螢光染劑加以標識後，並進行PCR，增幅成功後之產物，委外進行電泳分析，再利用GeneScan 2.1 和Genotyper 2.0 (PEApplied Biosystems)等軟體估算各個微衛星基因座的長度。
- (3)、估計後之長度資料，再利用Arlequin 2.0 (Schneider et al., 2000) 軟體，估計各地區樣本間之固定指數(Fst)，並檢定是否具顯著遺傳變異。
- (4)、以各地區樣本間之固定指數(Fst)為距離係數，以用MEGA 2 (Kumar et al., 2001)軟體建構樣本間之UPGMA樹。
- (5)、參考過去系群判別之結果，綜合評判東海、台灣海峽及南海產斑節蝦蝦資源之系群結構，以作為往後系群評估之依據。

三、結果與討論

所有被分析之紅斑赤蝦Efl- α 插入子序列之核苷酸歧異度(π)為0.933%，各樣本 π 值範圍從1.021% (CD)至0.838% (ECS)之間 (Table 1)。檢定各樣本間固定指數(Fst)值，顯示除TC-CD與ECS-HK兩樣本配對間沒有顯著差異外，其餘各配對間皆有顯著的差異(Table 2)。以Fst值為距離係數，建構各樣本之UPGMA樹狀圖發現，TC與CD樣本為一群；ECS與 HK 為另一群(Fig. 2)。全部樣本、各採樣族群及不同分支之Fu's F值皆顯著，顯示此研究海域之紅斑赤蝦族群有擴張之情形 (Table 1)。

利用PIMA (PCR Isolation of Microsatellite Arrays)，共找出六組可用的微衛星序列基因座，其相對引子序列、重複序列片段、片段大小等相關資料如Table 3 所示。根據此六組基因座設計可用的引子，並將所得數據以Arlequin 3.1軟體分析。對偶基因數、異型合子期望值與觀測值等數據如Table 4所示。本研究開發之六個微衛星基因座，皆具有高度的遺傳

變異，其平均的allele豐富度(A_R) 範圍從6.62到9.89，平均異質性(H_e) 從0.741到0.830。所有的loci皆顯著於哈溫平均 (Hardy-Weinberg equilibrium)。檢定各樣本間固定指數(F_{st})值，顯示TC 與 ECS、ECS 與 SCS，ECS 與 CD及,TC 與 CD 配對間有顯著的差異(Table 5)。以 F_{st} 值為距離係數，建構各樣本之UPGMA樹狀圖發現(Fig. 3)，ECS為一群；TC、CD 與 HK 為另一群。

過去利用形態形質及粒線體DNA分析紅斑赤蝦之系群結果顯示，東海及台灣海峽產之紅斑赤蝦分屬不同之系群，本研究中亦顯示相同的結果(Fig. 2及Fig. 3)。從UPGMA樹狀圖(Fig. 2)顯示出四個樣本可分為TC-CD 及ECS-HK兩大群；其中ECS及HK雖屬同一群，但是兩樣本之 F_{st} 值具有顯著的差異(Table 2)，顯示來自ECS及HK的紅斑赤蝦應屬不同的系群；造成這樣的原因可能是東海及香港沿岸的紅斑赤蝦可能有混合的情形；造成混合的原因可能是中國沿岸流，將東海長江口之紅斑赤蝦之幼蝦從東海，穿過台灣海峽，而帶至南海而造成的。另外，利用微衛星基因座分析之結果顯示，東海與其它三個海域的樣本遺傳上皆有顯著的差異(Table 5)；且從UPGMA圖來看(Fig. 3)，四個樣本可分為二群；東海一群；其它三個地方一群。

從以上結果顯示，本研究海域產之紅斑赤蝦至少可分為二個系群，一個位於東海北部；另外一個則為台灣海峽(TC與CD)及南海(HK)。唯本研究之結果，仍須更進一步之檢視。

參考文獻

劉瑞玉·鍾振如 (1986) 南海對蝦類。農業出版社。

Lee, C. Y. 1986. Studies on the fisheries biology of the whishered velvet shrimp (*Metapenaeopsis barbata*) in southwestern water of Taiwan. Master thesis of graduate school of fisheries, National Taiwan college of Marine Science and Technology, 65 pp.,

Moritz, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.

Pepin, P., and S. M. Carr. 1992. Morphological, meristic, and genetic analysis of stock structure in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Newfoundland shelf. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1924-1933.

Quan, J., Z. Zhuang, J. Deng, J. Dai and Y. P. Zhang. 2004. Phylogenetic relationships of 12 Penaeoidea shrimp species deduced from mitochondrial DNA sequences. *Biochemical*

Genetics, 42: 331-345.

Rohlf, F. J. 1990. NT-SYS, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System-Version 2.02. Exeter Software, New York.

Tong, J. G., T. Y. Chan and K. H. Chu. 2000. A preliminary phylogenetic analysis of *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) based on mitochondrial DNA sequences of selected species from the Indo-West Pacific. J. Crustacean Biol. 20: 51-549.

Tzeng, T. D., C. S. Chiu and S. Y. Yeh. 2001. Morphometric variation in red-spot prawn (*Metapenaeopsis barbata*) in different geographic waters off Taiwan. Fish. Res., 53(3):211-217. (SCI)

Tzeng, T. D., C. S. Chiu and S. Y. Yeh. 2005 Growth and Mortality of the Red-Spot Prawn (*Metapenaeopsis Barbata*) in the Northeastern Coast off Taiwan. J. Fish. Soc. Taiwan, 32(3): 229-238.

Tzeng, D. D. and S. Y. Yeh. 1995. Growth parameters of red-spot shrimp, *Metapenaeopsis barbata*, from the adjacent waters off Taichung Harbor. J. Fish. Soc. Taiwan, 22(1): 53-68.

Voloch, C. M., P. R. Freire and C. A. M. Russo. 2005. Molecular phylogeny of penaeid shrimps inferred from two mitochondrial markers. Gen. Mol. Res. 4(4): 668-674.

Wu, C. C. 1984. Survey of shrimp in Taiwan Strait and biological studies of thick shell shrimp (*Metapenaeopsis barbata*). Bull. Taiwan. Fish. Res. Inst., 37: 67-82.

Wu, C. C. 1985. Studies on the shrimp fishery and their fishing ground in Taiwan. Bull. Taiwan. Fish. Res. Inst., 39: 169-197.

Yamada, U., M. Tagawa, S. Kishida and K. Honjo. 1986. Fishes of the East China Sea and the Yellow Sea. Contributions from the Seikai Regional Fisheries Research Laboratory, No. 422.

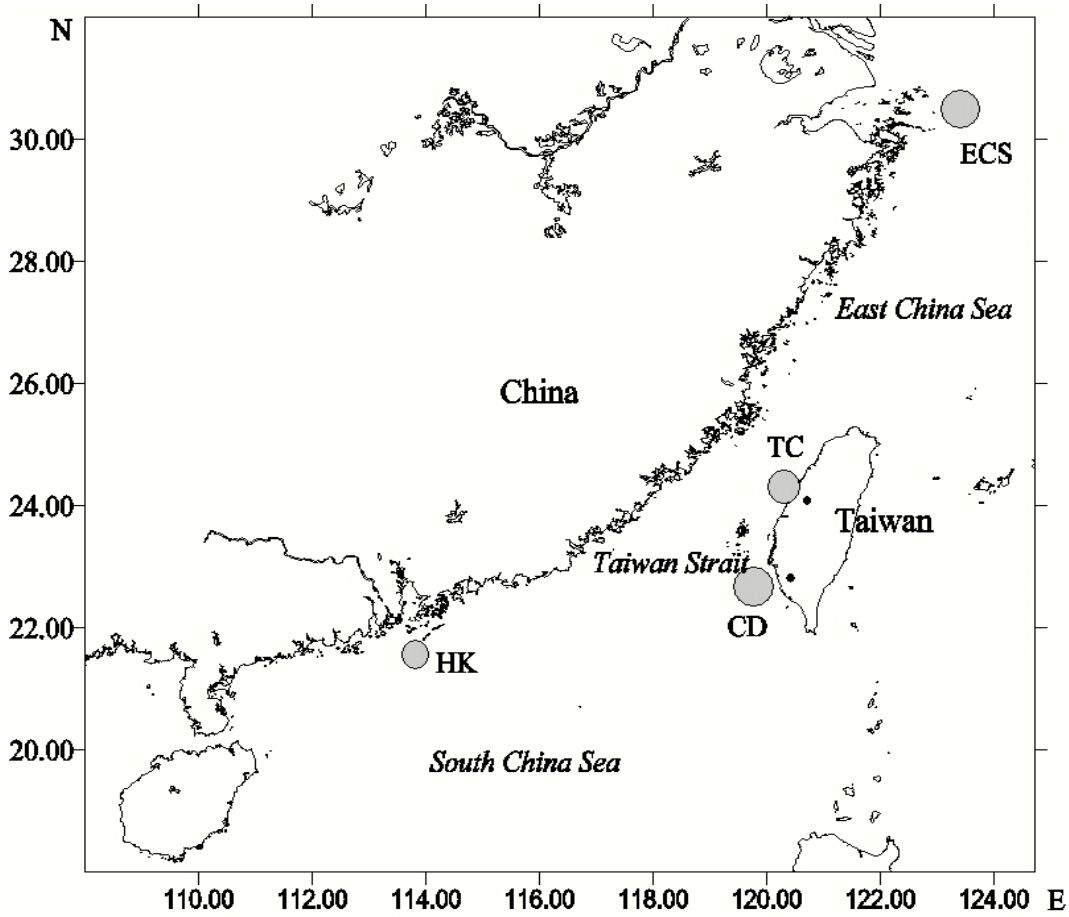


Fig. 1. Shaded areas show the sampling areas.

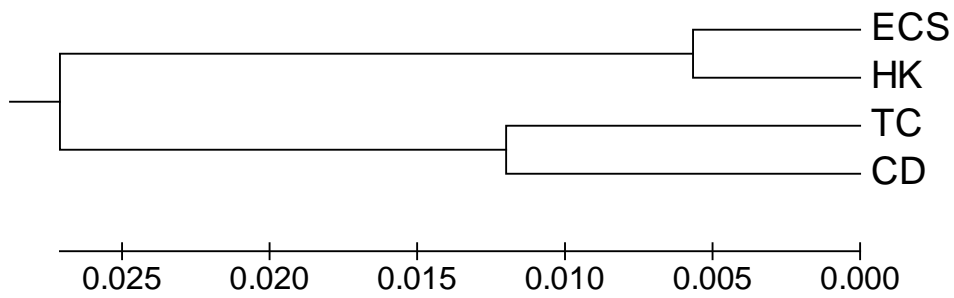


Fig.2. UPGMA tree showing relationships among four sampling areas based on elongation factor 1.

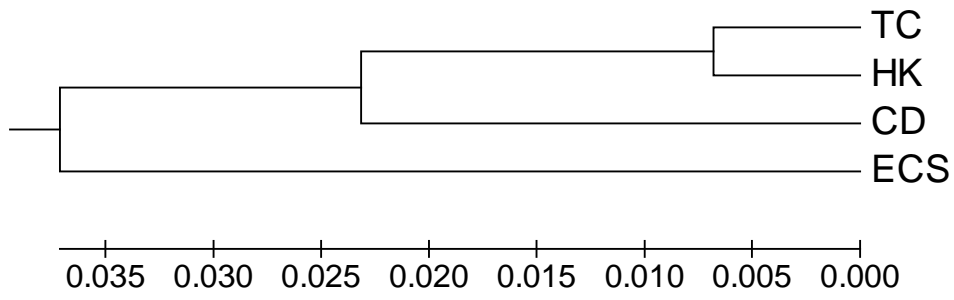


Fig. 3. UPGMA tree showing relationships among four sampling areas based on six microsatellite loci.

Table 1. Code of sampling area, sample size (n), number of haplotypes (n_h), number of polymorphic sites, gene diversity (h) and nucleotide diversity (π) with 95% confidence interval, Tajima's D, and Fu's F statistics in four red-spotted prawn populations.

Code	Sampling site	n	n_h	S	h	π	Tajima's D	Fu's F
ECS	East China Sea	28	11	12	0.839±0.049	0.00838±0.00235	-1.55609	-5.680**
TC	Waters off Taichung	30	10	16	0.722±0.077	0.00887±0.00219	-1.94247*	-3.854*
CD	Waters off Cheding	39	18	22	0.845±0.054	0.01021±0.00147	-2.07182*	-13.459**
HK	Waters off Hongkong	42	12	16	0.797±0.046	0.00848±0.00135	-1.77044	-5.404**
Total		139	36	40	0.824±0.03	0.00933±0.00086	-2.28609**	-34.492**

Table 2. F_{ST} values between four red-spot prawn populations.

	ECS	TC	CD
TC	0.0594**		
CD	0.0461**	0.0240ns	
HK	0.0113ns	0.0604**	0.0509**

** $P < 0.01$, ns = not significant ($P > 0.05$).

Table 3. Six microsatellite loci for *M. barbata*.

Locus	Primer sequence(5' to 3')	Repeat motif	Size range (bp)	Total no. of alleles	Tm °C
MIMB 01	F: GTCTCTCAATGACCCCCTTG R: GGAGGAATGGAGGGTGAGAT	(CT)34	150-240	27	50
MIMB 02	F: CAATCGCGCCTCTTACTT R: GGCAAAAAGAATGGTAATTGGT	(CA)9	139-169	12	54
MIMB 03	F: TCTATATGTGTGTCCGCGTGT R: CATGTTTCAGTATGATGTGTCTATCG	(TG)9	153-197	22	54
MIMB 04	F: TGATTGCGAAGGTCATCAAG R: TGAAAGGAAAGATTCGAGGAGA	(TC)9	170-210	9	50
MIMB 05	F: GCCTTGCTTCGTTCAAAGAG R: AAGAGAAAAAGAGAGATGGGTATG	(CA)15	137-167	7	50
MIMB 06	F: CAGACAACCAAATAGATTGAAAGA R: TGAGGGAAAGTTTTTGTGAGG	(GA)38	217-275	10	50

Table 4. Sample sizes (N), number of alleles (A), allelic richness (AR), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, probability value estimates regarding deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (P) by microsatellite loci for *M. barbata* populations

		Microsatellite							
		loci							
Population	Parameter	MIMB 1	MIMB 2	MIMB 3	MIMB 4	MIMB 5	MIMB 6	Mean	
TC	A	11	13	11	11	5	6	9.5	
(N=36)	AR	10.26	10.44	8.88	9.83	4.82	5.80	8.34	
	H_o	0.35	0.389	0.171	0.364	0.233	0.032	0.257	
	H_e	0.89	0.867	0.685	0.883	0.715	0.794	0.805	
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
ECS	A	9	10	6	6	5	5	6.8	
(N=24)	AR	9	9	5.82	5.97	4.9	5.00	6.62	
	H_o	0.389	0.304	0.083	0.136	0.050	0.000	0.160	
	H_e	0.865	0.700	0.673	0.753	0.676	0.777	0.741	
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
HK	A	10	17	15	14	7	7	11.7	
(N=39)	AR	9.15	13.19	11.87	11.48	6.83	6.84	9.89	
	H_o	0.289	0.406	0.324	0.436	0.051	0.103	0.268	
	H_e	0.800	0.845	0.842	0.875	0.785	0.834	0.830	
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
CD	A	10	10	11	11	7	12	10.2	
(N=37)	AR	9.15	8.03	9.28	10.07	5.80	9.54	8.64	
	H_o	0.286	0.364	0.206	0.243	0.147	0.216	0.244	
	H_e	0.848	0.798	0.797	0.883	0.741	0.825	0.815	
	P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		

Table 5. Matrix of pairwise F_{ST} between four populations of *M. barbata* based on microsatellite loci.

	ECS	TC	CD
TC	0.08316*		
CD	0.07399*	0.05497*	
HK	0.06555*	0.01361	0.03768

** $P < 0.01$, ns = not significant ($P > 0.05$).

計畫成果自評

本研究第二年度(98 年度)之主要目的及擬完成之工作項目為 (1) 利用Elongation factor I-alpha (efl- α)基因中之插入子序列及六個微衛星基因座來判別東海、台灣海峽及南海產紅斑赤蝦之系群遺傳結構；及(2) 撰寫利用此兩分子標誌分析所得之系群結構報告。根據本研究分析結果顯示東海、台灣海峽及南海產之紅斑赤蝦至少可分為二個不同的系群；一個在東海北部；一在台灣海峽及南海。此研究成果具有一定學術價值，可發表於學術期刊上；另外，利用此兩分子標誌來判別系群結構之研究進行中，可讓相關研究人員學習到DNA萃取、純化及定序之技術，並讓相關研究人員瞭解到不同之系群判別法所需之資料及注意事項，並學習到不同分析軟體之操作。從以上之研究過程及成果顯示，實際研究內容與原計畫內容相符合，並已達到本研究第二年度預期之目標。

無研發成果推廣資料